

氏 名 えびさわ しげる
海老澤 茂

学 位 の 種 類 博士（医学）

学 位 記 番 号 富医薬博甲第 195 号

学位授与年月日 平成 28 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
東西統合医学専攻

学 位 論 文 題 目 Regulation of spinal interleukin-6 expression is involved in
anti-allodynic effect of yokukansan in mice with neuropathic
pain
(抑肝散による神経障害性疼痛マウスの機械的アロディニア抑制作用に脊髄でのインターロイキン 6 発現制御が関与する)

論 文 審 査 委 員

(主査)	教 授	山崎 光章
(副査)	教 授	田村 了以
(副査)	教 授	村口 篤
(副査)	教 授	清水 忠道
(指導教員)	教 授	嶋田 豊

論文内要の要旨

〔目的〕

神経障害性疼痛は主に感覚神経の損傷により引き起こされ、そのコントロールは非常に困難である。疼痛機序の解明と治療法の開発のため、様々な神経障害性疼痛モデルが作製され、研究されてきた。脊髄のミクログリアやアストロサイトから放出される ATP や、interleukin- (IL-) 6、IL-1 β 、tumor necrosis factor alpha などのサイトカイン、一酸化窒素、プロスタグランジン、brain-derived neurotrophic factor など、様々な因子が神経障害性疼痛に関与していることが分かってきた。しかし、神経障害性疼痛に関連するこれらの要素を制御し、疼痛を抑制できる医薬品は数少ない。

抑肝散は蒼朮、茯苓、川芎、釣藤鈎、当帰、柴胡、甘草の7種類の生薬からなる漢方処方で、不眠、神経症、小児の夜泣きに加えて、近年では認知症に関連した幻覚やイライラなどの行動・心理症状、さらには神経障害性疼痛にも使用されるようになってきた。しかし、抑肝散が神経障害性疼痛をコントロールする機序については不明である。また、坐骨神経部分結紮による機械的アロディニアの発生には、脊髄におけるIL-6の発現増強が関与していることが知られている。そこで、坐骨神経部分結紮マウスモデルを用いて、抑肝散の神経障害性疼痛に及ぼす効果と、その機序に脊髄におけるIL-6に対する制御が関与しているか否かについて検討した。

〔方法〕

1. 坐骨神経部分結紮マウスモデルの機械的アロディニア

実験には雄性 ICR 系マウスを用いた。坐骨神経部分結紮マウスモデルは、麻酔下にて坐骨神経の1/3から1/2を結紮して作製した。抑肝散エキス (1 g/kg)、蒼朮エキス (200 mg/kg)、甘草エキス (100 mg/kg)、及び蒼朮エキス (200 mg/kg)と甘草エキス (100 mg/kg)の混合物を、坐骨神経結紮後4日目より1日1回7日間、連日経口投与した。機械的アロディニア（健常では反応しない刺激に対して痛覚過敏反応を生じる状態）は、0.16 gの強度のフォンフライフィラメントを用いて後肢足蹠への刺激に対する反応をスコア化して検討した（0点：反応なし、1点：後肢を挙げる、2点：足をばたつかせるまたは舐める）。

2. IL-6の脊髄くも膜下腔注入による機械的アロディニア

マウスの脊髄くも膜下腔にIL-6 (1 pmol/site)を注入し、機械的アロディニアを誘発した。抑肝散エキスをIL-6注入2時間前に経口投与し、その効果を評価した。

3. リアルタイム PCR

脊髄 (L3-L6) の後角側より total RNA を抽出し、IL-6 mRNA の発現レベルを Real-time reverse transcription polymerase chain reaction 法で測定した。

4. 免疫組織染色

脊髄における IL-6 の分布は、アストロサイトの活性マーカーとして glial fibrillary acidic protein

(GFAP)、ミクログリアの活性マーカーとして ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba-1)、神経細胞のマーカーとして NeuN を用いて脊髄の凍結切片を IL-6 抗体と二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて蛍光を検出することにより評価した。

〔結果〕

1. 坐骨神経部分結紮による機械的アロディニア

坐骨神経部分結紮により、術後 4 日目から、評価し得た少なくとも 11 日目まで機械的アロディニアを認めた。

2. 機械的アロディニアに対する薬剤の効果

抑肝散エキスは、坐骨神経部分結紮によって誘発される機械的アロディニアを軽減した。蒼朮エキス、及び蒼朮エキスと甘草のエキスの混合物も機械的アロディニアを軽減した。一方、甘草エキスは抗アロディニア効果を示さなかった。

3. IL-6 の脊髄くも膜下腔注入による機械的アロディニアに対する抑肝散の効果

脊髄くも膜下腔に IL-6 を注入することにより機械的アロディニアが生じた。抑肝散エキスはこのアロディニアを抑制しなかった。

4. 脊髄における IL-6 の遺伝子発現に対する薬剤の効果

坐骨神経部分結紮術後 11 日目において、脊髄（L3-L6）の後角側の IL-6 mRNA 発現は増強した。抑肝散エキス、蒼朮エキス、及び蒼朮エキスと甘草エキスの混合物は、この IL-6 mRNA 発現増強を抑制したが、甘草エキスは IL-6 mRNA の発現に影響を及ぼさなかった。免疫組織染色による検討では、術後 11 日目において IL-6 の発現を GFAP 陽性アストロサイトと Iba-1 陽性ミクログリアに認めたが、NeuN 陽性ニューロンには認めなかった。

〔考察及び総括〕

坐骨神経部分結紮マウスモデルにおいて、抑肝散及びその構成生薬である蒼朮は機械的アロディニアを軽減し、脊髄後角側における IL-6 mRNA 発現を抑制した。一方、抑肝散は IL-6 の脊髄くも膜下腔注入による機械的アロディニアに対して効果を及ぼさなかった。以上より、抑肝散及び蒼朮の抗アロディニア作用には、脊髄後角における IL-6 mRNA の発現抑制が関与していることが示唆された。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

【目的】

神経障害性疼痛は、感覚神経の損傷により引き起こされ、臨床においては最も治療に難渋する疼痛である。これまで、様々な神経障害性疼痛モデルが作製され、疼痛機序の解明とともに治療方法の開発がなされてきたが、いまだにこの疼痛を軽減することの出来る医薬品は数少ない。抑肝散は、蒼朮、茯苓、川芎、釣藤鈎、当帰、柴胡、甘草の7種類の生薬からなる漢方処方で、不眠、神経症、小児の夜泣き、認知症に加えて、近年では神経障害性疼痛にも使用されるようになってきた。しかし、抑肝散が神経障害性疼痛を制御する機序については不明である。そこで、海老澤君は、坐骨神経部分結紮神経障害性疼痛マウスモデルを用い、機械的アロディニアの発生に関与することが知られている脊髄後角の interleukin (IL) -6 に着目し、抑肝散の神経障害性疼痛に及ぼす効果と、この制御機序について検討した。

【方法】

実験には、雄性 ICR 系マウスを用いた。坐骨神経部分結紮モデルは、麻酔下にて坐骨神経の 1/3 から 1/2 を結紮して作製した。抑肝散エキス (1g/kg)、蒼朮エキス (200mg/kg)、甘草エキス (100mg/kg)、及び蒼朮エキス (200mg/kg) と甘草エキス (100mg/kg) の混合物を、坐骨神経部分結紮後 4 日目より 1 日 1 回 7 日間、連日経口投与した。神経障害性疼痛の代表的症状である機械的アロディニアは、0.16g の強度のフォンフライフィラメントを用いて後肢足蹠への刺激に対する反応をスコア化して検討した (0 点 : 反応無し、1 点 : 後肢を挙げる、2 点 : 足をばたつかせるまたは舐める)。

脊髄 (L3-L6) 後角より total RNA を抽出し、IL-6 mRNA の発現レベルを real-time reverse transcription polymerase chain reaction 法で測定した。脊髄における IL-6 の分布は、アストロサイトの活性マーカーとして glial fibrillary acidic protein (GFAP)、ミクログリアの活性マーカーとして ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba-1)、神経細胞マーカーとして NeuN を用いて脊髄の凍結切片を IL-6 抗体と二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて蛍光を検出する事により評価した。

【結果】

坐骨神経部分結紮により、術後 4 日目から、評価しえた少なくとも 11 日目まで機械的アロディニアを認めた。抑肝散エキスは、この機械的アロディニアを軽減した。さらに、蒼

朮エキス、及び蒼朮エキスと甘草エキスの混合物も機械的アロディニアを軽減した。一方、甘草エキスは抗アロディニア効果を示さなかった。

脊髄くも膜下腔に IL-6 を注入することにより機械的アロディニアが生じたが、抑肝散エキスはこのアロディニアを抑制しなかった。

坐骨神経部分結紮術後 11 日目において、脊髄後角の IL-6 mRNA 発現は増強した。抑肝散エキス、蒼朮エキス、甘草エキス、及び蒼朮エキスと甘草エキスの混合物は、この IL-6 mRNA 発現増強を抑制したが、甘草エキスは IL-6 mRNA の発現に影響を及ぼさなかった。免疫組織染色による検討では、術後 11 日目において IL-6 の発現を GFAP 陽性アストロサイトと Iba-1 陽性ミクログリアに認めたが、NeuN 陽性神経細胞には認めなかった。

【総括】

坐骨神経部分結紮マウスモデルにおいて、抑肝散及び蒼朮エキスは機械的アロディニアを軽減し、脊髄後角における IL-6 mRNA 発現を抑制した。これらのことから、抑肝散及び蒼朮エキスが脊髄後角の IL-6 遺伝子発現を制御することによって抗アロディニア効果を発揮することを初めて明らかにした点は大いに新規性があり、蒼朮エキスによる神経障害性疼痛治療に対する臨床的な応用も期待できる。さらに、脊髄後角 IL-6 を目標とした神経障害性疼痛に対する治療方法開発の可能性を見いだしたことは今後の臨床的な発展性を期待させる。以上より本審査委員会は本研究を博士(医学)の学位に十分値すると結論した。